



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Microbiologia Paulo de Góes
Concurso Público para provimento efetivo de vagas no cargo de
Professor da Carreira de Magistério Superior

Edital UFRJ nº 54, de 30 de janeiro de 2024 (Consolidado com
seus editais de retificação) Versão inicial publicada no DOU em:
02/02/2024 | Edição: 24 | Seção: 3 | Página: 71 a 80, código
MC-055 – área Bacteriologia Médica, do Departamento de
Microbiologia Médica – Instituto de Microbiologia Paulo de
Góes – CCS – UFRJ.

PROVA ESCRITA

CANDIDATO: 602130

Questão 1: Ponto 3

A identificação, bem como a tipificação de bactérias patogênicas é necessária para o entendimento da dinâmica bacteriana, para o dimensionamento de estratégias de tratamento e prevenção, além de estudos epidemiológicos. Para tal, diversas técnicas fenotípicas e moleculares podem ser aplicadas.

Antes da realização de tais técnicas um primeiro e importantíssimo passo é a escolha e coleta da amostra clínica a ser coletada. A amostra precisa ser representativa do local da infecção para que o agente correto seja identificado. Por exemplo, de uma otite média deve ser coletado um swab de secreção de ouvido. Ainda,

②

Os espécimes devem ser coletados e acondicionados em materiais (tubos, frascos, ...) estéreis e transportados rápida e adequadamente ao laboratório. Os meios de transporte são importantes para acondicionar o material (suavemente com meio de transporte, por exemplo) ~~sem~~ mantendo o agente viável.

Para seguir, pode-se iniciar com os métodos fenotípicos, que apesar de nem sempre podem ser aplicados (para bactérias não cultiváveis), ainda é o padrão-ouro para muitas bactérias.

Para espécimes de sítios estéreis, a microscopia direta da amostra clínica tem valor diagnóstico. Pode ser realizada a coloração de Gram (bactérias se coram de roxo ou vermelho, sendo gram-positivas e gram-negativas, respectivamente, de acordo com diferenças estruturais da parede celular); microscopia de campo escuro (condensador é tucado e o fundo fica escuro), impregnação pela prata ou Fontana-Tribondeau, microscopia de fluorescência (auramina-rodamina), sendo essas 3 últimas de aplicação para espiroquetas, que são delgadas e não se ~~colam~~ coram bem por gram; Albert-Lauborn, para visualização de grânulos metacromáticos de *Corynebacterium diphtheriae*; Ziehl-Neelsen, para micobactérias, que possuem parede rica em ácidos micólicos, sendo álcool-ácido resistentes, dentre as principais técnicas.

Então, a amostra clínica deve ser cultivada em meios artificiais para o isolamento do agente. Os meios podem ser simples; enriquecidos (como o AS, usados para bactérias fastidiosas); seletivos, que possuem inibidores, selecionando o agente de interesse; diferenciais, que têm compostos que reagem com o agente mudando a cor do meio/colônia; seletivos-diferenciais; e os cromogênicos, que podem ou não ser seletivos e não normalmente diferenciais, por cromógenos no meio que reagem com a bactéria e nos indica quem é. Diferentes temperaturas (37°C , 42°C , 4°C) e atmosferas ($5\% \text{CO}_2$, baixa tensão de O_2) podem ser usados de acordo com a bactéria de interesse. Semeadura em esptamento normalmente.

A seguir, com a bactéria isolada pode seguir para a microscopia, caso não seja. Amostra de sítio estéril e não tenha sido feita anteriormente. E então, seguir com testes bioquímicos e fisiológicos. Eles incluem testes para fermentação de carboidratos (diferencia espécies de enterococos), presença de enzimas (~~dehidrogenase~~ hipuricase, para diferenciar espécies de estreptococos β -hemolíticos), utilização de aminoácidos (uso da lisina no teste LIA diferencia enterobactérias), fermentação ou oxidação da glicose (O/F glicose, identifica quem é fermentador, ou oxida glicose ou é assimilatório) ... Com esses testes pode-se ou não chegar até a identificação.

④

cas de espécie, mas normalmente são considerados presumptivos. É uma confirmação sorológica muitas vezes necessária, como para Streptococcus agalactiae, onde os testes de CPH e hipurato são presumptivos e apenas a sorologia para ~~este~~ o ^{grupo de} carboidrato C de parede celular é confirmatório. Ainda, a realização de testes bioquímicos e fisiológicos (apenas) miniaturizados, como no sistema API, permite realizar uma quantidade de testes bem superior do que normalmente se fazia em tamanho normal e para muitas espécies, se chega à identificação.

Ainda assim, muitas vezes o confirmatório é pela sorologia. Podemos citar testes de aglutinação, hemaglutinação, imunodifusão, fixação do Complemento, ELISA, ... Todos baseados no fundamento da ligação Antígeno - Anticorpo.

Para o diagnóstico de bactérias não cultiváveis (clamídias, Coxiella sp., ...), assim como para confirmação de diversas espécies, os testes genotípicos, muitos vezes chamados de moleculares podem ser realizados. A técnica de PCR é a primeira de destaque. Ela amplifica a região alvo, nos permitindo detectá-la e visualizá-la no após gel de eletroforese. Diversas são as variações do PCR. Para a identificação, usa-se o rDNA 16S ou ge-

nos marcadores moleculares da espécie como alvo. Suas variações incluem PCR multiplex (vários alvos em uma reação só), nested PCR (PCR interno, onde uma sequência é amplificada primeiro para depois outra ser amplificada dentro da primeira), PCR de regiões repetitivas (ERIC-PCR, para enterobactérias; BOX-PCR, para gram-positivas normalmente). O MLVA ("multilocus VNTR analysis") se baseia também no PCR de regiões repetitivas em tandem de número variável do genoma e gera um perfil numérico, que quando padronizada, esse perfil (é o MLVA type) pode ser comparada inter-laboratorialmente. Tais técnicas são muito usadas para traçar o relacionamento genético e estudar a epidemiologia das bactérias.

Técnicas diversas podem ser usadas para esse fim. Podemos avaliar o DNA global de uma cepa ou partes específicas do genoma, sendo elas regiões repetitivas (como dito acima) ou regiões conservadas.

O MLST é uma técnica que analisa regiões conservadas. Normalmente 7 genes metabólicos são primeiro amplificados e então sequenciados. Cada variação de um nucleotídeo na sequência de um gene é um alelo diferente, e então uma sequência numérica/alelica é conseguida para

6

Cada cepa é o sequence type (ST). Tal técnica é universalmente defendida, e com ~~os~~ bancos de dados para diversas bactérias (disponível no pubMLST, para a maioria) e possibilitando também a comparação entre diferentes laboratórios.

O PFGE usa análise ^{de perfil} de restrição do genoma total das bactérias e é mais usado em casos de surtos. Softwares disponíveis online ou de acesso pago (eBurst, BioNumerics, ...) possibilitam a análise dessas técnicas, onde através de coeficientes de similaridade etc podemos construir diagramas e dendrogramas e avaliar o relacionamento genético da cepa.

O Sequenciamento é a técnica que, apesar do alto custo, avalia todo o genoma e podemos analisar ~~os~~ os dados gerados e extrair diversas informações, sendo a mais completa obviamente.

Começou com Sanger na década de 70, usando terminadores de cadeia, mas hoje com NGS ("next-generation sequencing"), incluindo métodos de 2ª e 3ª geração, o sequenciamento ocorre de forma mais rápida e fácil.

As metodologias são diversas. ~~As~~ Os métodos de 2ª geração utilizam a realização de bibliotecas genômicas (com utilização de adaptadores) e geram "short-reads" (sequências curtas). São Pirosequen

ciamento (liberação de pirofosfato ao incorporar o nucleotídeo); SOLiD Pacbio (liberação fluorescente quando a sonda anela, incorporando o nucleotídeo); Illumina (amplificação por pontes, em clusters, e quando o nucleotídeo é incorporado, libera a cor do fluoróforo acendendo todo o cluster), sendo esse o método mais usado; e Ion Torrent (liberação de H^+).

Na 3ª geração, temos por exemplo, o Nanopore (usa poros protéicos e cada nucleotídeo passa ali por vez e é detectado) e o SMRT Pacbio (usa DNA polimerase fixada na superfície, que detecta cada nucleotídeo). Esses geram long-reads e o sequenciamento é em tempo real. Os dados gerados precisam ser analisados. Softwares e linhas de comando nos auxiliam nisso. É vista a qualidade das sequências ^{após leitura ou adaptação} primeiro (FastQC, por exemplo), a análise taxonômica deve ser realizada (usando o Kraken, por exemplo), então o genoma deve ser montado (as reads são colocadas na ordem, seja por sobreposição com genoma de referência [resequencing] ou sobrepondo as reads [montagem de novo]) com o software SPAdes. E então anotado, onde os genes são analisados, ou seja, é onde identificamos os genes, pelo Prokka.

Técnicas de hibridização como Southern blotting (DNA), Northern blotting (RNA) e Western blotting (proteínas) podem ser usadas para reconhecer sequências de interesse através da hibridização de uma sonda com a sequência.

8

cia-alvo.

Ainda, técnicas de proteômica se destacam. O MALDI-TOF, por exemplo, identifica amostras com base no perfil (espectro) de proteínas (ribossomais) de 2-20 kDa que é comparado com o seu banco de dados. É técnica fenotípica e molecular, que vem sendo cada vez mais usada na identificação bacteriana. Por ele também podem ser ver marcadores plasmídicos associados a sorotipos ou doenças, etc. Nesse âmbito, a técnica de espectroscopia de infravermelho (FT/IR) consegue também, pela vibração de carboidratos gerada pelo IR, traçar espectros que podem ser usados para tipar cepas.

Outras técnicas, como SDS-PAGE, 2D-PAGE foram técnicas mais iniciais da proteômica, mas ainda podem ser usados em estudos mais específicos.

Assim, além das técnicas fenotípicas que ainda são muito importantes, técnicas como MALDI-TOF, o FT/IR e sequenciamento são hoje as mais significativas para nossa identificação, mas também o estudo do relacionamento genético, da epidemiologia e da adaptação das bactérias ~~no~~ ~~no~~ no contexto mundial. Tais estudos auxiliam nas estratégias de controle e prevenção desses patógenos.

Questão 2: Ponto 7

Diversas bactérias apresentam a estrutura da parede celular da seguinte forma: membrana externa, espaço periplasmático com fina camada de peptidoglicano. São as gram-negativas. Dentro delas, alguns grupos e espécies se destacam e são abordados a seguir.

No gênero Neisseria, temos a Neisseria meningitidis e a Neisseria gonorrhoeae de destaque. Elas são cocos gram-negativos, não esporulados, fastidiosos que se diferenciam pela fermentação da maltose (N. meningitidis fermenta) e pela presença de cápsula (N. meningitidis produz). N. meningitidis é a principal causadora de meningite bacteriana, transmitida por aerossóis pessoa-pessoa. Os principais sorogrupos (definidos pela cápsula) são A, B, C, X, W135 e Y, onde apenas o X não é comum no Brasil. A adesão inicia com pili tipo IV e através de Omp e PorB, ~~a~~ que reorganizam a membrana do hospedeiro e facilitam a bactéria. Ali, ela se multiplica e é disseminada ganhando acesso ao sangue e meninges. Sintomas incluem rigidez na nuca, vômitos, cefalia, ^{o sequeio é liberado em locais e causa inflamação.} ... Em N. gonorrhoeae, os ~~mesmos~~ mecanismos de patogenicidade são similares, com pili tipo IV, PorB e Omp, mas ocorrendo no trato genital. É uma infecção sexual^{mente} transmitida, e nos homens causa

20

uretrite, podendo evoluir para epididimite, prostatite, ... Em mulher, muitos casos é assintomática, mas pode causar também uretrite e se evoluir para a DIP (doença inflamatória pélvica), compreendendo todo o trato genital reprodutor. As infecções são caracterizadas por secreções muco purulentas. O diagnóstico é em meio enriquecido, preferencialmente o agar chocolate em 5% CO₂. Testes bioquímicos e sorológicos podem ser feitos, assim como o MALDI-TOF para a identificação. Também pode fazer por PCR para genes marcadores da espécie. O gonococo particularmente tem facilidade de adquirir marcadores de resistência, sendo muito resistente à penicilina. Então, testes de susceptibilidade de anti microbianos (TSA) devem ser feitos para realizar o tratamento. Mas tratamento empírico para a meningite deve ser iniciado. Vacina para o meningococo está disponível no SUS, mas não contempla o sorogrupos B (esse, apenas vacina no privado), com doses aos 3 e 5 meses de idade. Diagnóstico do gonococo também pode ser feito usando GenProbe ou Gene Xpert (sonda e PCR, respectivamente), disponíveis comercialmente que identificam o patógeno rapidamente. Um importante grupo de Gram-negativos são as enterobactérias. São bacilos Gram-negativos, fermentadores que englobam muitas espécies. No qual, são classificados

de acordo com variações nos seus antígenos capsulares (K), flagelares (H) e/ou somático (O). São oxidase negativas.

A Escherichia coli é o principal do grupo. Apesar de estar na microbiota intestinal, apresenta patótipos que tem atributos de virulência que a possibilitam causar sérios infecções.

A ETEC (E. coli enterotoxigênica) apresenta as toxinas LT (termo lábil) e ST (termo estável) que atuam aumentando o AMPc, levando à perda de água e íons, causando diarreia. A dose infectante é baixa e chamada de diarreia do viajante.

A EPEC (E. coli enteropatógena) tem SST3 que injeta o receptor T₆ na célula hospedeira e vai aderir à intimina na bactéria. É uma adesão muito forte e vai desorganizando a actina, formando uma lesão em pedestal na célula hospedeira (lesão "attachment/effacing"). Esses fatores são codificados pela ilha de patogenicidade LEE.

A EPEC (enteroefluente) apresenta genes irp que vai invadir a célula (mediado também por SST3) e a bactéria, dentro da célula hospedeira usa a actina ~~para~~ do hospedeiro para se propelir pela célula e lateralmente, para células vizinhas.

A STEC (E. coli toxina Shiga, anteriormente enterohemorrágica) produz 2 toxinas: Shiga 1 e Shiga 2. São similares (100% e 60%)

(12)

à da shigella e atuam levando à diarreia hemorrágica, podendo causar a síndrome hemolítico-urêmica (SHU).

~~Também, patógeno~~

A EPEC (enteroagregativa) forma agregados de bactérias nas células hospedeiras.

Também, patótipos extraintestinais ~~ocorrem~~ ocorrem. A UPEC (uropatogênica) tem afinidade por células uropiteliais e causam infecções urinárias.

A Salmonella é outro importante gênero. Causa 3 tipos de infecções:

1. Febre entérica tifóide: S. typhi e o agente.

2. Febre entérica paratifóide: por S. paratyphi.

3. Salmoneloses: por S. enteritidis, ...

São transmitidas por consumo de carne de ave, ovos crus ou mal cozidos. A tifóide é a mais grave. As manifestações causam diarreia (as salmoneloses são mais brandas e podem durar mais), cefaleia, mialgia, ...

A Shigella é outro gênero de enterobactéria importante. Seu único reservatório é o homem. Através de seus genes ipa (A, D...) induzem a sua invasão na célula hospedeira; saem do vacúolo, e com genes ics conseguem reorganizar a actina do hospedeiro que formam uma cauda e vai "impulsionando" a bactéria, inclusive para outras células laterais.

A Yersinia tem a Y. pestis (Transmite a peste negra através da pulga) e a Y.

enterocolítica (causa enterocolite xerera). Ela impede o fagocitossoma, por mais de ribossomos aderidos à membrana do vacúolo e sai se multiplicando ali.

No qual, essas enterobactérias podem ser identificadas com ~~testes~~ cultivo usando meios seletivo-indicadores (EMB, por exemplo), seguido de testes bioquímicos (fermentação açúcares, uso de aminoácidos), e serológicos. Há testes de aglutinação para E. coli O157:H7, por exemplo, a principal clone de STEC. MALDI-TOF e PCR específicos também podem ser usados para a identificação. O tratamento não é indicado p/ infecções do TGI, pois são auto-limitantes, e antibióticos podem aumentar produção de toxina Shiga, por exemplo. O controle é feito por boas condições de higiene, não ingerir alimentos crus, mal ~~de~~ cozidos,...

Dentre os bacilos gram-negativos nos fermentadores, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter spp. se destacam.

P. aeruginosa é oxidase positiva, produtora de pigmentos (piocianina e pioverdina) e importante causadora de infecções do trato respiratório (TR) e urinário (TU). Dentre seus principais fatores de virulência estão o slime e a formação de biofilme. Além disso, ela é muito persistente e resistente, se destacando nos IRAS (infecções ~~relacionadas~~ relacionadas com assistência à saúde). Con-

(14)

aque cresce em meio simples, mas meios seletivos e diferenciados são bons para identificar (como meios que selecionam gram negativos).

Acinetobacter é outra espécie muito recorrente em IRAS, que se destaca pela alta resistência. Para essas infecções, pode-se usar pólিমixina e outros, considerados de último recurso. Isto que, as Enterobactérias e Acinetobacter foram incluídos em listas de patógenos prioritários de resistência da OMS e CDC, e TSA deve ser realizado (resistência aos carbapenêmicos).

~~Enterobactérias~~ Ainda, fermentadores como Vibrio e Aeromonas se destacam.

V. cholerae causa cólera. Toxina colérica aumenta AMPc, leva à secreção de água e íons, dando diarreia. Associada a locais sem saneamento básico. Transmissão por água contaminada e reservatório um alimento marinho. Causa diarreia "água de arroz".

A caracterização molecular de todas essas bactérias pode ser realizada por técnicas de MLST ou sequenciamento, que vai permitir ver o relacionamento genético das amostras e ver diferenças associadas com a resistência ou virulência auxiliando a traçar estratégias de controle e prevenção específicas.

Ainda, Legionella pneumophila é outra espécie gram-negativa importante. Ela con-

sua doença dos legionários, uma infecção do trato respiratório que evolui para pneumonia. Ela está presente em ambientes de água, e sobrevive bem em ambientes úmidos como ar condicionado. Seu controle está relacionado à limpeza e manutenção de dutos e aparelhos de ar condicionado.

(16)

Questão 3: Ponto 9.

Diversos são os mecanismos que atuam na indução bacteriana, onde destes citamos: mutações, recombinações, transferência horizontal de genes (THG) e CRISPR.

Mutações podem ocorrer naturalmente (durante replicação do DNA) ou serem induzidas (agentes físicos, químicos e biológicos). Podem ser por deleções, inserções ou troca de nucleotídeos. Isso pode mudar toda a sequência de leitura e gerar proteínas truncadas, ou inserir códon de terminação, ou trocar códon por outro que seja para o mesmo aminoácido, sendo estas últimas silenciosas. Na resistência aos quinolonas, geralmente uma mutação única (SNP, single nucleotide polymorphism) nos genes *gyrA* ou *parC* são os responsáveis. Na resistência à penicilina é necessário um acúmulo de mutações para codificar uma PBP diferente.

A recombinação pode ser homologa (sequência pareada) ou não homologa, onde a sequência é diferente e normalmente ocasionada por elementos genéticos móveis (EGM). Precisa de genes rec.

A ~~transferência~~ THG é dada de 3 formas: transformação, conjugação e transdução. São muitos vírus dados por EGM, que devem ser mencionados aqui. Os plasmídeos são mo-

lêcular de DNA ~~tem~~ circular extra cromossômico que podem ou não ter aparato para se transferirem de forma independente para outras células. Os elementos de transposições (ET) incluem IS (sequências repetidas invertidas, as sequências de inserção), os transposons simples e os transposons compostos (são formados por IS). Os ETs são elementos que "saltam" no genoma, podendo se inserir aqui e ali por recombinação. Ainda temos os integrons e cassetes gênicos que têm genes para a sua integração e excisão do genoma (int e exc).

A transformação é captação de DNA livre (normalmente de célula morta) no ambiente. A célula precisa estar competente: reconhecer o DNA e incorporá-lo. A bactéria Streptococcus pneumoniae tem alta capacidade de realizar transformações.

A conjugação é transferência de DNA por contato célula-célula. No gram negativo, tem o pílus sexual que liga as células e depois retrai, unindo as células e aí 1 fita de DNA é passada (se perpetuando nas 2 células). Para gram positivo, a célula doadora libera feromônio que se capta pela célula receptora, que se aproxima, fazendo contato e o DNA (1 fita) é passado. Alguns elementos, como os transposons conjugativos, também tem genes int e pode ser passado e se integrar no cromossomo.

(18)

somo da nova célula.

A transdução é feita por fagos (vírus que infectam ~~bactérias~~ ^{generalizada} bactérias). Pode ser transdução ~~transmissível~~, quando o fago temperado entra no ciclo lisogênico e aí ele se integra no ~~seu~~ cromossomo bacteriano e se perpetua ali. No outro tipo de transdução, o fago está no ciclo lítico e no momento do impacotamento do seu genoma, pode impacotar erroneamente o DNA bacteriano junto e levar consigo para infectar outra célula.

Qualquer das formas de THG possibilita a aquisição de novos genes e elementos incluindo genes de resistência, virulência e adaptações para novas bactérias, essencial para a sua evolução.

Por exemplo, o transposon conjugativo da família *Tn916*, que carrega o *tetM* (resistência à tetraciclina) e de resistência ao mercurio pode também carregar outras resistências e é muito disseminado em espécies de *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*.

Além disso, elementos CRISPR são importantes também. Eles são o sistema imune adaptativo de bactérias, descoberto recentemente. A cada contato com DNA invasor, ^{o fago normalmente} ela "guarda" um pedaço entre regiões palindrômicas no seu genoma, ~~guardando~~ ^{guardando} os espaços dos. Quando entra um con

tato de novo com o DNA, o reconhece e clona. Isso estimula tanto a bactéria quanto ao fago (DNA invasor) a evoluir.

Todas essas estratégias e mecanismos são essenciais para a evolução bacteriana. Bactérias como Staphylococcus apresentam uma alta plasticidade genômica, e isso a permite adaptar em diversos ambientes, tanto no organismo hospedeiro (na sua interação) ~~como na resistência~~ através da apresentação de novos fatores de virulência, como em ambientes de pressão seletiva, podendo apresentar resistência aos antimicrobianos.

Assim, por meio desses mecanismos as bactérias conseguem adquirir e apresentar os artefatos (virulência, resistência e adaptações) necessários para irem se modulando de acordo com o ambiente e se perpetuando na sua linhagem evolutiva.